

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 279–281

Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Cefotaxim in Serum- und Harnproben

Von G. Seibert und Angelika Biebach

Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main

(Eingegangen am 8. Mai/28. November 1980)

Zusammenfassung: Eine einfache, enzymatische Methode zur Bestimmung des Cephalosporinderivates Cefotaxim wird beschrieben. Die Methode ist relativ spezifisch und ermöglicht eine schnelle und genaue Bestimmung des Antibiotikums in Serum und Harn ohne Vorbehandlung der Proben. Die Nachweisempfindlichkeit ist mit der von anderen Methoden zur Cefotaximbestimmung vergleichbar.

An enzymic method for the determination of cefotaxim in serum and urine

Summary: An enzymic method is described for the determination of the cephalosporin derivative, cefotaxim, in serum and urine. The method is simple, relatively specific, rapid and accurate, and does not involve pretreatment of samples. The sensitivity is similar to that of other methods of cefotaxim assay.

Einführung

Für die Bestimmung von Cephalosporinen in komplexen Proben wie Serum oder Urin sind derzeit zwei Methoden gebräuchlich: Die am meisten verwendete Methode ist die des mikrobiologischen Diffusionstestes auf Agar-Platten (1, 2), die in vielen Fällen von der Hochdruck-flüssigchromatographie (HPLC) (3) abgelöst wird.

Beide Methoden haben, insbesondere bei der Verarbeitung großer Probenanzahlen, Nachteile.

Der mikrobiologische Test liefert die Ergebnisse erst nach 24 Stunden und ist außerdem mit einer relativ großen Streuung der Meßwerte behaftet (1). Die HPLC erfordert eine Vorbehandlung der Proben zur Entfernung makromolekularen Materials und ist, besonders was die Durchführung mit großen Probenzahlen betrifft, sehr aufwendig.

Wir berichten hier deshalb über eine enzymatische Methode zur Bestimmung des neuen Cephalosporinderivates Cefotaxim. Diese Methode erlaubt eine einfache und sensitive Bestimmung von Cefotaxim in Serum oder Harn mit einer hohen Empfindlichkeit und guten Reproduzierbarkeit.

Die Methode beruht auf der kompetitiven Hemmung einer β -Lactamase durch ein β -Lactam-Antibiotikum (4, 5, 6). Das Cephalosporinderivat Padac (Abb. 2) (7)

wird von der β -Lactamase aus *Enterobacter cloacae* P99 leicht hydrolysiert. Dabei ist ein Farbumschlag von rot nach gelb zu beobachten, der im Photometer bei 550 nm zu verfolgen ist. Die Umsetzungsgeschwindigkeit dieses leicht spaltbaren Cephalosporins wird nach Zugabe von Cefotaxim durch eine kompetitive Hemmung verringert, wobei der Grad der Enzymhemmung mit der Menge Cefotaxim in der zu analysierenden Probe korreliert ist. Als leicht umzusetzendes Substrat eignet sich auch Cephaloridin, wobei die Absorptionsänderung bei 255 nm gemessen werden muß.

Material und Methoden

Die verwendeten Cephalosporinderivate (Cefotaxim und Cephaloridin) sind kommerziell erhältlich. Das farbige Cephalosporinderivat 7-(Thienyl-2-acetamido)-3-[2-(4-N,N-dimethyl-amino-phenyl-azo)-pyridinium-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (Padac) wurde freundlicherweise von Dr. Schindler, Hoechst AG, Frankfurt/M., zur Verfügung gestellt.

Enzympräparation

Zur Enzympräparation wurde *Enterobacter cloacae* P99 in belüftetem *Müller-Hinton*-Medium bei 37 °C herangezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH 7) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Sedimentation der Zelltrümmer bei 15 000 g in 20 min wurde der Überstand durch Gelfiltration an LKB Ultragel ACA44 gereinigt. Die Enzymaktivität enthaltenden Fraktionen wurden bei – 20 °C aufbewahrt und als Enzymlösung verwendet. Die Aktivität des Enzyms war 38 mkat/kg Protein, bei Verwendung von Cephaloridin als Substrat.

Testansatz

Gesamtvolumen in der Küvette: 2,1 ml, davon:

1,7 ml Phosphatpuffer pH 7,0 (0,1 mol/l);

0,2 ml einer Lösung von 200 mg/l Cephaloridin oder Padac in 0,1 mol/l Phosphatpuffer pH 7,0;

0,1 ml β -Lactamase-Lösung.

Nach Durchmischen und Zugabe von 0,1 ml der zu analysierenden Lösung wurde die Absorption über 100 s bei 20 °C im Photometer verfolgt. Die Wellenlänge war bei der Verwendung von Cephaloridin 255 nm, bei der Verwendung von Padac 550 nm.

Eine Standardkurve wurde mit Padac als Substrat nach Zusatz bekannter Mengen Cefotaxim in Serum oder Harn aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Wie Abbildung 1 zeigt, ist unter den angegebenen Bedingungen in einem Bereich zwischen 0 und 300 ng/Testansatz eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen zugesetzter Menge Cefotaxim und Absorptionsänderung während der ersten 100 Sekunden Reaktionszeit gegeben.

Dabei spielt es für den Verlauf der Standardkurve keine Rolle, ob das Cefotaxim in Serum, Harn oder Pufferlösung bestimmt wird. Die Bindung von Cefotaxim an Proteine des Serums scheint also keinen Einfluß auf den Nachweis zu haben. Die mittlere Abweichung der Standardwerte lag stets bei maximal 7%.

Bei Verwendung von Proben aus klinischen Versuchen ist die Methode ebenfalls gut zu verwenden. Sie liefert in kürzester Zeit Werte, die mit Ergebnissen aus anderen Methoden sehr gut korrelieren. Bei Zusatz eines internen Standard zu Serum- oder Harnproben aus klinischen Versuchen ist, wie Tabelle 1 zeigt, stets ein Anstieg des Cefotaximgehaltes in der Höhe des zugesetzten Cefotaxim zu messen. Tabelle 2 zeigt Mittelwert und Standardabweichung bei 4 Proben bekannter Konzentration, wobei jeweils 4 Parallelbestimmungen der einzelnen Werte durchgeführt wurden.

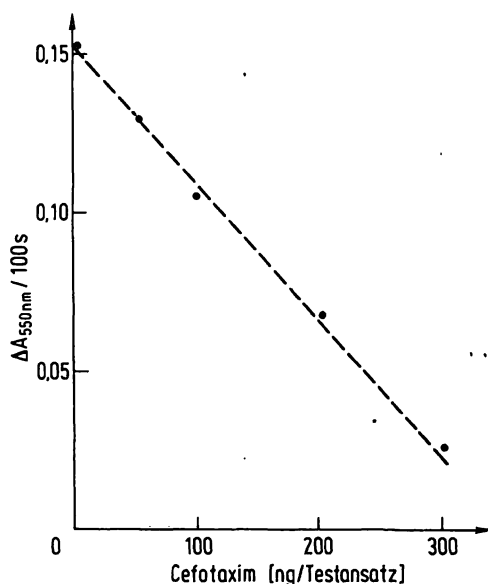


Fig. 1. Standardkurve zur Bestimmung von Cefotaxim in Serum oder Harn.

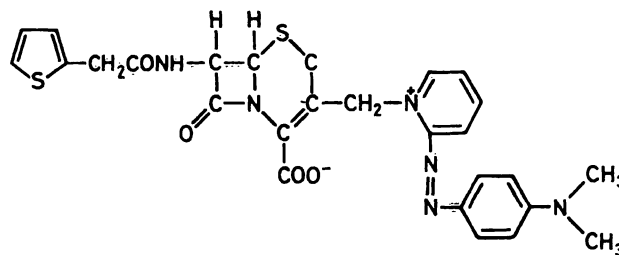


Fig. 2. Cephalosporinderivat 7-(Thienyl-2-acetamido)-3-[2-(4-N,N-dimethylamino-phenyl-azo)-pyridinium-methyl]-3-céphem-4-carboxylat (Padac).

Tab. 1. Zusatz eines internen Standard von Cefotaxim zu einer Serumprobe. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 5 Bestimmungen.

Cefotaxim, enzymatisch bestimmt, vor Zusatz [mg/l]	Cefotaxim, zugesetzt [mg/l]	Cefotaxim, enzymatisch bestimmt, nach Zusatz [mg/l]
98 ± 4,8	10	112 ± 6,8
98 ± 4,8	50	159 ± 7,4
98 ± 4,8	75	179 ± 9,3
98 ± 4,8	100	216 ± 4,5

Tab. 2. Bestimmung von Cefotaxim in Serum. Bei dem angegebenen Meßwert handelt es sich um den Mittelwert aus 4 Parallelbestimmungen.

Cefotaxim, in der Probe eingesetzt [µg]	Cefotaxim, in der Probe gefunden [µg]	
	\bar{x}	s
50	52,8	1,6
75	76,4	1,8
100	99,2	4,2
150	152,0	6,0

Desacetyliertes Cefotaxim, das unter Umständen als Metabolit in klinischen Proben vorhanden sein kann, stört die Messung nach Zusatz bis zu 500 ng/Probe nicht. Es wird mit dem verwendeten Enzym lediglich Cefotaxim erfaßt.

Wenn zu dieser Bestimmung kein Photometer im UV-Bereich zur Verfügung steht, so ist es möglich, durch Verwendung eines farbigen Cephalosporinderivates anstelle von Cephaloridin ebenfalls eine Bestimmung durchzuführen. Versuche mit dem farbigen Cephalosporinderivat Padac lassen eine einfache Quantifizierung von Cefotaxim auch unter Verwendung eines im sichtbaren Bereich arbeitenden Photometers zu. Allerdings verläuft dann die Standardkurve etwas flacher als bei Verwendung von Cephaloridin.

Die Präparation und Aufbewahrung des Enzyms sollte auch unter den Bedingungen der klinischen Routine keine Schwierigkeiten bereiten. Selbst wenn die Reinigung durch Gelchromatographie nicht möglich ist, sind

durch die Verwendung eines einfachen Zellysates gute Ergebnisse zu erzielen. Allerdings ist dann nach unserer Erfahrung die Stabilität des Enzyms etwas geringer als nach weitergehender Reinigung. Die durch Gelchromatographie gereinigten Enzymfraktionen zeigen bei Aufbewahrung bei -20°C über mehrere Wochen keinen signifikanten Aktivitätsverlust.

Neben der Bestimmung von Cefotaxim ist auch die Bestimmung anderer Cephalosporinderivate möglich. Allerdings müssen Enzym und Substrat sowie Enzym- und Substratkonzentration variiert werden, um jeweils optimale Empfindlichkeit zu erreichen. So ist neben der Bestimmung von verschiedenen Entwicklungspräparaten die Bestimmung von Cephalexin und Cefuroxim gelungen.

Literatur

1. Bonnet, J. K., Broche, J. L., Brenner, E. J. & Kirby, W. M. (1966), *Appl. Microbiol.*, **14**, 170–177.
2. Kavamagh, F. (1975), Antibiotic Assays-Principles and Precautions, in *Meth. Enzymol.*, Vol. **XLIII** (Nash, J. H., ed.) Acad. Press New York, p. 55–69.
3. Tsuji, K. (1975), High pressure liquid chromatography of antibiotics, in *Meth. Enzymol.*, Vol. **XLIII** (Nash, J. K., ed.) Acad. Press New York, p. 300–320.
4. Cole, M., Elson, S. & Fullbrook, P. D. (1972), *Biochem. J.* **127**, 295–308.
5. O'Callaghan, C. H., Muggleton, P. W., Kirby, S. M. & Ryan, D. M. (1966), *Antimicrob. Ag. Chemother.* **337–343**.
6. O'Callaghan, C. H. & Morris, A. (1972), *Antimicrob. Ag. Chemother.* **442–448**.
7. Schindler, P. & Huber, G. (1981), Use of Padac, a novel chromogenic β -lactamase substrate, for the detection of β -lactamase producing organisms and assay of β -lactamase inhibitors/inactivators "Proceedings on enzyme inhibition", Symposium in Basel 1980, im Druck.

Priv.-Doz. Dr. Gerhard Seibert
Hoechst AG
Bakteriologisches Labor
D-6230 Frankfurt am Main 80

